

Artigo / Article

Avaliação do transplante de medula óssea alogênico por meio do estudo de regiões de repetições seqüenciais no genoma humano (VNTRs e STRs)

Evaluation of allogeneic bone marrow transplantation by analysis of repeated sequences in the human genome (VNTRs and STRs)

Rita K. Santana¹Luiz C. Mattos²Milton A. Ruiz³Haroldo W. Moreira¹

Os objetivos deste estudo foram estabelecer um protocolo para a análise de minissatélites ou VNTRs e microssatélites ou STRs em pacientes que se submeteram ao TMO alogênico; verificar a validade da metodologia e dos loci estudados e avaliar o tipo de recuperação do paciente. Foram analisados o DNA do paciente anterior e posterior ao transplante de 14 indivíduos e dos respectivos doadores. Amplificações por PCR de seis loci: DIS80, SE33, HumTH01, 33.6, HumARA e HumTPO foram realizadas. Os produtos amplificados foram separados por eletroforese vertical em gel de poliacrilamida, e os fragmentos visualizados por coloração pela prata. Esse procedimento mostrou ser válido na verificação da recuperação alogênica, autóloga e provavelmente na quimérica. Da somatória dos loci estudados, 63,1% apresentaram resultados possíveis de serem avaliados e, desses, 19,0% mostraram resultado informativo, 13,1% parcialmente informativo e 31,0% não informativo. Os 36,9% restantes não foram possíveis de avaliação. Dos loci avaliados, o que demonstrou maior índice de resultado informativo foi o SE33, parcialmente informativo o HumTPO e não informativo o HumTH01, sendo o locus 33.6 o que mais apresentou resultados não possíveis de serem avaliados. Por outro lado, determinou-se a recuperação do paciente posterior ao transplante em 71,4% dos indivíduos, sendo que, desses, 90% apresentaram recuperação alogênica e 10% recuperação autóloga. Rev. bras. hematol. hemoter. 2004;26(2):109-113.

Palavras-chave: VNTRs; STRs; transplante de medula óssea; PCR.

Introdução

Os VNTRs (Variable Number of Tandem Repeats) ou minissatélites e os STRs (Short Tandem Repeats) ou microssatélites são regiões de repetições seqüenciais no genoma humano altamente polimórficas.¹ Devido a esse alto grau de variabilidade, a probabilidade de encontrarmos o mesmo padrão em dois indivíduos (com exceção de gêmeos monozigóticos) é mínima, sendo, portanto, basicamente único para cada indivíduo.²

Deste modo, a análise de VNTRs e STRs tem sido amplamente utilizada na identificação genotípica individual, na medicina forense, no teste de identificação de vínculo genético, na pesquisa antropológica e na caracterização de animais extintos, fornecendo dados importantes para estudos antropológicos e evolutivos³ e, mais recentemente, tem apresentado validade no monitoramento do transplante de medula óssea alogênico.⁴

Após o transplante de medula óssea alogênico é importante distinguir se as células presentes são de ori-

¹Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – Unesp, Araraquara, SP.

²Departamento de Biologia Molecular da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, SP.

³Unidade de Transplante de Medula Óssea do Hospital de Base da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, SP.

Correspondência para: Haroldo W. Moreira

Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – Unesp

Caixa postal 502 – 14801-902 – Araraquara-SP, Brasil

E-mail: hmoreira@fcar.unesp.br

gem do doador ou do paciente, para a necessária avaliação do transplante, quer seja na enxertia do mesmo, quer seja na recidiva.⁵

O padrão de recuperação do sistema hematológico de pacientes submetidos ao transplante de medula óssea alogênico pode ser avaliado por marcadores citogenéticos e por fenotipagem de células vermelhas.⁶ Todavia, recentemente, o quimerismo de pacientes submetidos ao transplante de medula óssea alogênico tem sido avaliado pela detecção do polimorfismo de VNTRs e STRs pela reação de amplificação auxiliada pela polimerase em locais suficientemente informativos.⁷

Os objetivos deste estudo foram estabelecer um protocolo para a análise de VNTRs e STRs pela amplificação gênica (PCR), seguida de separação dos produtos amplificados por eletroforese vertical em gel de poli-acrilamida e coloração com sais de prata; verificar a validade da metodologia utilizada e dos *loci* estudados e avaliar se a amostra do paciente posterior ao transplante de medula óssea alogênico apresenta recuperação autóloga, alogênica ou quimérica.

Casuística e Método

Nesse estudo foram analisados 14 pacientes de ambos os sexos e com idades que variavam dos 21 aos 48 anos de idade, provenientes de várias localidades do Brasil e que se submeteram ao transplante de medula óssea alogênico realizado na Unidade de Transplante de Medula Óssea do Hospital de Base da Fundação Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, Estado de São Paulo, Brasil. Foi verificado o padrão genotípico no paciente anterior ao transplante e no doador, bem como o padrão de recuperação do paciente posterior ao transplante.

O material genético foi extraído de leucócitos obtidos de sangue periférico e separados por gradientes de concentração, através de método salino,⁸ modificado conforme metodologia de nosso laboratório.

A verificação do padrão de recuperação após o transplante de medula óssea alogênico foi realizada por meio da análise de seis *loci* localizados em cinco cromossomos diferentes, cujas informações estão apresentadas na Tabela 1.^{9,10,11} Por um procedimento estratégico, esse modelo de análise foi representado pela amplificação simultânea de três desses marcadores, o multiplex I constituído pelos *loci* D1S80, SE33, HumTH01 e o multiplex II pelos 33.6, HumARA, HumTPO. As seqüências dos primers utilizadas para cada *locus* foram descritas anteriormente.^{7,9,12-15}

Tabela 1
Localização cromossômica e tamanho dos fragmentos em pb dos loci analisados

Locus	Cromossomo	Tamanho dos fragmentos em pb
D1S80	1	250-650
SE33	6	200-350
HumTH01	11	180-200
33.6	1	500-1000
HumARA	x	263-305
HumTPO	2	106-130

Tabela 2
Sexo e data de nascimento do paciente e do doador nos indivíduos analisados

Número do paciente	Sexo do paciente	Data de nascimento do paciente	Sexo do doador	Data de nascimento do doador
02	F	21/07/1957	M	27/05/1962
03	M	31/07/1972	M	14/02/1979
05	M	26/08/1978	F	08/09/1970
06	M	05/02/1981	M	05/02/1989
07	F	26/02/1973	F	11/02/1981
08	M	14/09/1977	F	18/05/1980
09	M	26/02/1962	M	27/11/1954
10	M	10/01/1968	M	19/07/1977
11	M	18/08/1955	M	03/05/1969
12	M	25/12/1965	F	04/02/1958
13	F	14/12/1973	F	27/04/1952
14	F	19/06/1977	M	10/09/1975
15	M	18/07/1975	M	26/10/1972
16	M	06/09/1971	F	18/02/1980

F = feminino; M = masculino

A amplificação gênica foi realizada com o auxílio de uma mistura composta por 0,25 µg de DNA genômico; 0,25 mM de cada dNTP; 2,5 unidades de Taq DNA polimerase; 50 mM de KCl; 10 mM de Tris-HCl pH 8,0 e 2,5 mM de MgCl₂ para um volume final de reação total de 50 µL. Nessa, era adicionada, na dependência do multiplex analisado, uma mistura de primers a 10 pmol/µL, sendo 0,25 mM de cada oligonucleotídeo iniciador.

O material foi submetido a 94° C por cinco minutos, seguidos de 28 ciclos a 95° C durante trinta segundos e 62° C durante trinta segundos, acrescidos de um "hold" a 62° C durante vinte minutos.

Os produtos da amplificação foram separados por sistema eletroforético vertical utilizando como suporte gel de poli-acrilamida a 7,8%, sendo os fragmentos visualizados por coloração com sais de prata e arquivados em fotos Polaroid.

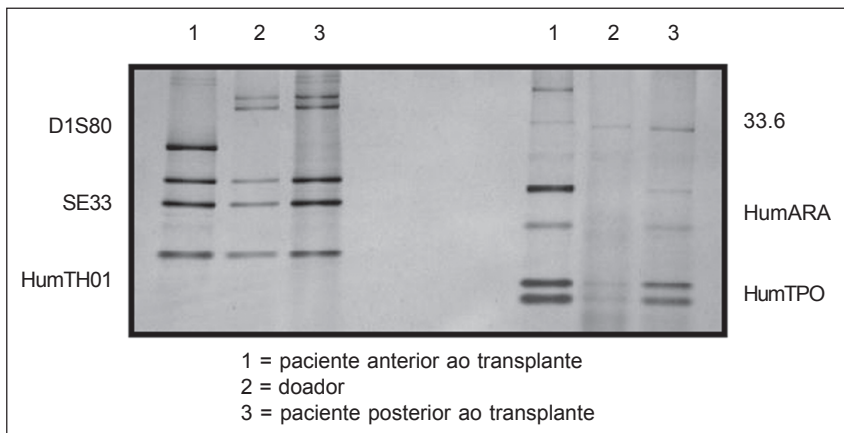


Fig.1 – Detecção do padrão de recuperação alogênico pela técnica da PCR utilizando multiplex I e multiplex II

Resultados

O procedimento aplicado permitiu constatar resultados possíveis de avaliação representados por aqueles em que a visualização das bandas nas amostras do paciente anterior e posterior ao transplante e do doador fossem nítidas e resolutivas.

Desse modo, quando possível poderíamos observar resultado informativo de recuperação autóloga, resultado informativo de recuperação alogênica, resultado informativo de recuperação quimérica, resultado parcialmente informativo de recuperação alogênica, resultado parcialmente informativo de recuperação autóloga e resultado não informativo.

No entanto, quando não ocorriam as amplificações das três amostras relacionadas a um procedimento de transplante (paciente no período anterior e posterior ao transplante, e doador), analisadas para cada locus testado ou quando apareciam bandas espúrias que dificultavam a localização dos alelos e conseqüentemente a sua interpretação, esse resultado era denominado falho ou não possível de avaliação.

Através dos resultados obtidos pode-se verificar que, do total de loci estudados, 63,1% apresentaram resultados possíveis de serem avaliados, sendo 19,0% com resultados informativos, 13,1% parcialmente informativos e 31,0% não informativos. Os 36,9% restantes não foram possíveis de avaliação considerando a não visualização das bandas correspondentes.

Por outro lado, nesse estudo foi possível verificar, em porcentagem, o locus que fornecia um número maior de informações. Assim, o locus que apresentou maior porcentagem de resultado informativo foi o SE33 (31,3%), seguido dos D1S80 e HumTH01 (18,7%), 33.6 e HumARA (12,5%) e do HumTPO (6,3%).

Dos que se mostraram com resultados parcialmente informativo o HumTPO representou 36,3%, seguidos dos D1S80 e HumTH01 (18,2%) e SE33, 33.6 e HumARA (9,1%).

Já para aqueles que se mostraram não informativo o HumTH01 representou 30,8%, os SE33 e HumTPO (23,1%),

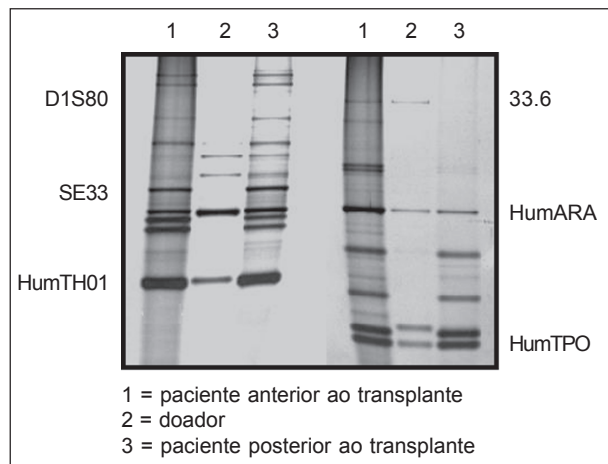


Fig.2 – Detecção do padrão de recuperação autólogo pela técnica da PCR utilizando multiplex I e multiplex II

o HumARA (19,2%) e o 33.6 (3,8%). Aqueles com informações consideradas falhas, o locus 33.6 representou 32,3%, seguidos dos D1S80 (29,0%), HumARA (19,4%), HumTPO (9,6%), SE33 (6,5%) e HumTH01 (3,2%).

Através desse estudo pode-se verificar que, em 71,4% dos indivíduos analisados foi possível determinar o padrão de recuperação com base na informação de pelo menos um locus com resultado informativo. Desses, 90% apresentaram padrão de recuperação alogênica, visualizada na Figura 1, e 10% apresentaram padrão de recuperação autóloga, expressa na Figura 2. Nos 28,6% restantes não foi possível determinar o padrão de recuperação, pois os loci estudados apresentaram apenas resultado parcialmente informativo. Desses, 75% apresentaram resultado parcialmente informativo de recuperação alogênica e 25% apresentaram resultado parcialmente informativo de recuperação autóloga. Nesses casos, os resultados obtidos servem apenas para orientação e não para a confirmação do padrão de recuperação. Nesses casos, outros loci po-

deriam ser analisados para a verificação do padrão de recuperação desses pacientes.

Nas tabelas 2 e 3 apresentamos as características dos pacientes analisados e de seus respectivos doadores, bem como suas doenças, data do procedimento e da coleta após o transplante e o tipo de recuperação observada.

Discussão

Até o momento, existem poucos trabalhos que avaliam o transplante de medula óssea alogênico através da amplificação de VNTRs e STRs. Nesses, a recuperação do tipo alogênica tem sido a mais observada, sendo que essa foi relatada por Casado et al (1996), onde 70,6% dos doze pacientes estudados apresentavam esse modelo. Martinelli et al (1997) observaram esse tipo de recuperação em 66,7% dos seis pacientes analisados. Por sua vez, Vieira-Mion (2000) relata essa recuperação em 48,7% dos trinta e sete pacientes analisados. Os resultados apresentados até o momento por esses autores mostram-se condizentes aos obtidos no presente estudo.

Os autores acima citados relatam que a recuperação quimérica é a segunda forma mais observada, seguida da recuperação autóloga. Todavia, em nossos resultados não foi observada a recuperação quimérica. Esse fato, provavelmente, deve-se ao tipo de nossa amostra, pois entre elas, a grande maioria apresentava tempo de transplante superior a sessenta dias, tempo esse talvez suficiente para o estabelecimento do genótipo após o transplante.

Do total de pacientes analisados, em 28,6% não foi possível determinar o padrão de recuperação, pois os *loci* estudados apresentaram apenas resultados parcialmente informativos. Isso evidencia que, para esses pacientes, haveria a necessidade da análise de outros *loci* para a real verificação do padrão de recuperação, tais como: ApoB, 33.1, D21S11, FPS, HumVWA e H-ras, entre outros.

Esses resultados ficam na dependência do tipo de população analisada e de sua variabilidade genética, pois Vieira-Mion, em 2000, conseguiu determinar o padrão de recuperação em todos os trinta e sete pacientes estudados por meio da análise dos mesmos *loci* utilizados neste estudo, e observou o *locus* DIS80 como sendo o mais informativo.

Os resultados obtidos permitem concluir que essa metodologia é válida para verificação do padrão de recuperação alogênica, autóloga e provavelmente na quimérica. Além disso, com a análise dos *loci* propostos foi possível determinar o padrão de recuperação do paciente pos-

Tabela 3
Doença, data do transplante, data da coleta após o transplante e tipo de recuperação nos indivíduos analisados

Número do paciente	Doença	Data do transplante	Data da coleta após o transplante	Tipo de recuperação
02	L.M.A	12/10/2001	11/2002	Alogênica
03	L.M.C	31/07/2001	11/2002	Alogênica
05	D.H	31/07/2002	12/2002	Alogênica
06	L.M.C	19/08/2002	11/2002	Autóloga
07	L.M.C	24/07/2002	12/2002	P. alo
08	A.A	21/05/2001	12/2002	Alogênica
09	L.M.C	28/06/2001	02/2003	P. alo
10	L.M.C	19/12/2002	02/2003	Alogênica
11	L.M.C	18/09/2002	04/2003	Alogênica
12	L.M.C	19/02/2003	04/2003	Alogênica
13	L.M.C	20/01/2003	04/2003	P. auto
14	D.H	04/04/2002	04/2003	Alogênica
15	L.M.C	16/10/2002	04/2003	Alogênica
16	L.M.C	13/05/2000	04/2003	P. alo

L.M.C = leucemia mielóide crônica; D.H = doença de Hodgkin; L.M.A = leucemia mielóide aguda; A.A = anemia aplástica; P. alo = parcialmente alogênica; P. auto = parcialmente autóloga

terior ao transplante em 71,4% dos indivíduos analisados, sendo que, desses, 90% apresentaram padrão de recuperação alogênica e 10% padrão de recuperação autóloga.

Abstract

The purposes of this study were to establish a protocol for the analysis of minisatellites or VNTRs and microsatellites or STRs in patients who undergo allogeneic bone marrow transplantation; to verify the validity of the methodology and of the studied loci and to verify the type of recovery of the patient. The pre-transplant and post-transplant DNA of 14 recipients and their respective donors were analyzed. Six loci were amplified by PCR (DIS80, SE33, HumTH01, 33.6, HumARA and HumTPO). The amplified products were separated using a vertical polyacrylamide gel electrophoretic system and the resulting fragments were analyzed using silver staining. This procedure proved to be efficient in verifying autologous and allogeneic regeneration and probably chimerism regeneration too. Of the loci studied, 63.1% presented results which could be analyzed, 19% were informative results, 13.1% partially informative and 31.0% non-informative. The locus that most demonstrated the informative results was the SE33 locus, the one that showed the partially informative results was the HumTPO and the non-informative results was the

HumTH01. The 33.6 locus was the one that presented the majority of the results that could not be tested. Furthermore, it was possible to determine the patient regeneration after transplantation in 71.4% of the cases, 90% showed allogeneic regeneration and 10% autologous regeneration. Rev. bras. hematol. hemoter. 2004;26(2):109-113.

Key words: VNTRs; STRs; bone marrow transplantation; PCR.

Referências Bibliográficas

1. Hokama POM, Pardini MIMC, Colturato VAR, et al. Análise de regiões repetitivas do genoma como parâmetro de avaliação da "pega" do TMO-alogênico e do status quimérico. Rev Bras Hematol Hemoter 1999;21:23-27.
2. Lara FJS. Hibridização de ácidos nucléicos. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética 1995, p.89-99.
3. Farah SB. DNA segredos e mistérios. São Paulo: Sarvier 1997; 12,19,20,25,27,70,76:173-183.
4. Martinelli G, Trabetti E, Zacarria A, et al. In vitro amplification of hypervariable DNA regions for the evaluation of chimerism after allogeneic BMT. Bone Marrow Transplant 1993;12:115-120.
5. Zaccaria A, Rosti G, Testoni N, et al. Cytogenetic events after bone marrow transplantation for Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukemia. Leuk Res 1991;15:289-296.
6. Scharf SJ, Smith AG, Hansen JA, et al. Quantitative determination of bone marrow transplant engraftment using fluorescent polymerase chain reaction primers for human identity markers. Blood 1995;85:1.954-1.963.
7. Ugozoli L, Yam P, Petz LD, et al. Amplification by the polymerase chain reaction of hypervariable regions of the human genome for the evaluation of chimerism after bone marrow transplantation. Blood 1991;77:1.607-1.615.
8. Abdel-Rahman SZ. Isolation of DNA using salting-out procedure. J Biochem Toxicol 1994;9:191-198.
9. Anker R, Steinbrueck T, Donis-Keller H. Tetranucleotide repeat polymorphism at the human thyroid peroxidase (hTPO) locus. Hum Mol Genet 1992;1:137.
10. Leclair B, Frégeau CJ, Aye MT, et al. DNA typing for bone marrow engraftment follow-up after allogeneic transplant: a comparative study of current technologies. Bone Marrow Transplant 1995;16:42-55.
11. Smith AG, Martin PJ. Analysis of amplified variable number tandem repeat loci for evaluation of engraftment after hematopoietic stem cell transplantation. Rev Immunogenet 1999;1:255-264.
12. Budowle B, Chakaborty BR, Giusti AM, et al. Analysis of the VNTR locus D1S80 by the PCR followed by high resolution PAGE. Am J Hum Genet 199;48:137-144.
13. Edwards A, Civitello A, Hammond HA, et al. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. Am J Hum Genet 1991;49:746-756.
14. Edwards A, Hammond HA, Jin L, et al. Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. Genomics 1992;12:241-253.
15. Polymeropoulos MH, Rath DS, Xiao H, et al. Tetranucleotide repeat polymorphism at the human beta-action related pseudogene H-beta-Ac-psi-2 (ACTBP2). Nucleic Acids Res 1992;20:1.432.
16. Casado LF, Steegmann JL, Pico M, et al. Study of chimerism in long-term survivors after bone marrow transplantation for severe acquired aplastic anemia. Bone Marrow Transplant 1996;18:405-409.
17. Martinelli G, Trabetti E, Farabegoli P, et al. Early detection of bone marrow engraftment by amplification of hypervariable DNA regions. Hematologica 1997;82:156-160.
18. Vieira-Mion AL. Avaliação, através da análise de regiões hipervariáveis do genoma humano, da recuperação autóloga, alogênica ou quimérica em pacientes com anemia aplástica severa submetidos ao transplante de medula óssea. Dissertação (Mestrado em Genética) – Faculdade Universidade Federal do Paraná, Curitiba 2000; 108f.

Agradecimentos

Ao Laboratório de Imunogenética do Serviço de Análises Clínicas da UFPR, especialmente a Márcia Quiroga e a Ana Lúcia Vieira Mion, pelas contribuições, e ao Laboratório de Imunogenética do Hemocentro de São José do Rio Preto, na pessoa de Juliana Rodrigues Cintra, pela extração do material genético de algumas das amostras utilizadas.

Avaliação: Editor Associado, Nelson Hamerschlag e dois revisores externos.

Conflito de interesse: não declarado

Recebido: 20/12/2003

Aceito após modificações: 18/06/2004